

УДК 616.711-002

ГОРМОНАЛЬНЫЙ ДИСБАЛАНС И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ АНКИЛОЗИРУЮЩЕМ СПОНДИЛИТЕ

М. Л. Щербакова^{1*},
А. О. Кононова¹,
М. В. Ильин¹, доктор медицинских наук,
Н. А. Лапкина¹, кандидат медицинских наук,
А. А. Баранов¹, доктор медицинских наук

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, 150000, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, д. 5

РЕЗЮМЕ Цель – изучение взаимосвязи концентрации половых гормонов и функциональной активности нейтрофилов у больных анкилозирующим спондилитом (АС).

Материал и методы. Обследованы 82 пациента с АС. Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фиколла-урографина. Функциональную активность нейтрофилов исследовали хемилюминесцентным методом. Определение концентрации эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови – методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Результаты. При АС наблюдается увеличение уровня продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами, ассоциированное с повышением резервного потенциала образования супероксидного аниона и снижением резерва синтеза гидроксильного радикала, пероксида водорода и гипохлорной кислоты. Выявленные изменения биоцидности клеток происходят на фоне значительного снижения концентрации эстрадиола, повышения уровня тестостерона и коэффициента эстрогении. Установлено наличие прямой корреляционной зависимости между показателями содержания эстрадиола и резервным потенциалом продукции активных форм кислорода нейтрофилами. Выявлена сильная обратная корреляция между концентрацией тестостерона, резервными возможностями и уровнем продукции супероксидного радикала. Флогенный потенциал нейтрофилов прямо взаимосвязан с концентрацией тестостерона

Заключение. При АС наблюдается усиление кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, сопровождающееся увеличением резерва продукции супероксидного аниона и снижением резерва образования свободных радикалов кислорода на фоне уменьшения концентрации эстрадиола, повышения уровня тестостерона, коэффициента эстрогении, которые взаимосвязаны с показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилит, нейтрофил, эстрадиол, тестостерон.

* Ответственный за переписку (corresponding author): maria.cardio@mail.ru

Известно, что половые гормоны оказывают влияние на нейтрофилы, как непосредственно регулируя фагоцитарную и окислительную активность, так и опосредовано через модуляцию секреции цитокинов лимфоидными клетками. Женские половые стероиды, а также их комбинации модулируют секреторную функцию лимфоцитов, контролирующих фагоцитарную активность нейтрофилов благодаря повышению уровня интерлейкина (ИЛ-10) и снижению концентрации фактора некроза опухоли (ФНО- α) [3]. Эстрадиол дозозависимо повышает активность миелопероксидазы и эластазы, секретируемых нейтрофилами [1]. Действие это опосредовано через рецепторы эстрогенов, имеющиеся во всех иммунокомпетентных клетках, в том числе в нейтрофилах [9].

Помимо взаимодействия с рецепторами существует альтернативный путь эстрогенопосредованного взаимодействия через специальный протеин G, связывающийся с рецепторами GPER [2]. Установлено,

что женские половые гормоны в физиологических концентрациях способствуют задержке апоптоза нейтрофилов и увеличению внутриклеточной продукции активных форм кислорода [11].

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор способствует возрастанию респираторного взрыва в нейтрофилах, усиливает продукцию супероксидного анион-радикала и антителозависимую клеточную цитотоксичность [4]. Снижение его концентрации на фоне уменьшения содержания эстрогенов способствует увеличению хемотаксической подвижности нейтрофилов и приводит к их накоплению в очаге воспаления, стимулирует синтез ИЛ-6 и ИЛ-8 и увеличивает продукцию ФНО- α , который значительно усиливает системные воспалительные проявления [7].

Показано, что эстрадиол обладает антиоксидантными свойствами, окисляясь в присутствии пероксида

водорода, продуцируемого нейтрофилами в результате окислительного стресса, а тестостерон способствует снижению уровня апоптоза нейтрофилов. В то же время механизмы влияния половых гормонов на кислородзависимый метаболизм нейтрофилов до конца не изучены.

Целью исследования стало изучение взаимосвязи между концентрацией половых гормонов и показателями функциональной активности нейтрофилов у больных АС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 82 больных АС, в том числе 63 (76,8%) мужчины и 19 (23,2%) женщин, в возрасте от 27 до 69 лет (в среднем $50,2 \pm 9,1$ года). Диагноз АС устанавливался на основании модифицированных Нью-Йоркских критериев и классификационных критериев Европейской группы по изучению спондилитов. Диагноз верифицировали с помощью лабораторных и рентгенологических методов исследования. Группу контроля составили 25 относительно здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой наблюдения.

Выделение нейтрофилов периферической крови проводили на двойном градиенте плотности фикола-урографина. Функциональную активность нейтрофилов исследовали хемилюминесцентным методом. О степени функциональной активности нейтрофилов судили по спонтанной люминол-(сХЛл) и люцигенинзависимой (сХЛн) хемилюминесценции; результаты выражали числом импульсов в минуту (имп./мин). Заключение о функциональном резерве клеток делали по коэффициентам активации хемилюминесценции (КА ХЛл и КА ХЛн), которые рассчитывали как отношение индуцированного показателя (иХЛл и иХЛн) к спонтанному (сХЛл и сХЛн). В качестве индуктора кислородзависимого метаболизма нейтрофилов использовали 1×10^9 взвесь убитых нагреванием клеток *Staphylococcus aureus* штамма p-209.

Определение концентрации эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов «ИммуноФА-Эстрадиол/Тестостерон» (ЗАО «НВО Иммунотех», Россия). Рассчитывали коэффициент эстрогении как соотношение концентрации тестостерона и эстрадиола, выраженное в процентах (Т/Э, %).

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoftInc., США). Осуществлялась проверка нормальности распределения количественных признаков. В связи с тем, что исследованные признаки имели распределение, отличное от нормального, производилось вычисление медиан и интерквартильных интервалов (25%; 75%). Для сравнения двух независимых групп по одному признаку применяли критерий Манна – Уитни. Для изучения взаимосвязи двух признаков использовался корреляционный анализ по Спирмену. Критическое значение уровня статистической значимости принималось равным 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время имеются многочисленные данные относительно клеточных и молекулярных путей развития аутоиммунного воспалительного процесса, однако многое остается неясным, включая роль половых гормонов в активации или уменьшении воспалительных реакций. Исследование функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов при АС выявило гетерогенность показателей кислородзависимого метаболизма, обнаружив увеличение образования нейтрофилами активных форм кислорода, значительно превышающее уровень биоцидности клеток в группе контроля.

Показатели функциональной активности нейтрофилов у больных АС представлены в таблице 1.

Таблица 1. Функциональная активность нейтрофилов и содержание половых гормонов у больных анкилозирующим спондилитом

Показатель	Контроль (n = 25)	Анкилозирующий спондилит (n = 82)	p
сХЛл, $\times 10^4$, имп./мин	1,2 (0,5; 1,8)	7,2 (5,7; 9,8)	p < 0,0001
иХЛл, $\times 10^4$, имп./мин	1,1 (0,3; 2,8)	0,7 (0,2; 1,5)	p = 0,24
сХЛн, $\times 10^4$, имп./мин	0,7 (0,4; 1,3)	5,3 (1,6; 6,2)	p < 0,0001
иХЛн, $\times 10^4$, имп./мин	0,8 (0,1; 1,0)	2,2 (0,5; 6,7)	p = 0,001
КА ХЛл	1,1 (0,7; 1,8)	0,08 (0,02; 0,6)	p < 0,0001
КА ХЛн	0,7 (0,3; 1,8)	0,9 (0,3; 1,2)	p = 0,34
Эстрадиол, пмоль/л	140,0 (55,0; 171,4)	49,0 (39,0; 74,0)	p = 0,0002
Тестостерон, нмоль/дл	0,38 (0,28; 0,65)	5,6 (3,7; 7,2)	p < 0,0001
Коэффициент Т/Э, %	0,23 (0,21; 0,32)	10,6 (7,2; 15,0)	p < 0,0001

При анализе изучаемых показателей, представленных в таблице 1, выявлено увеличение уровня продукции свободных радикалов кислорода нейтрофилами по данным сХЛлл и сХЛлн, в несколько раз превышающее показатели группы контроля ($p < 0,0001$), ассоциированное с повышением резервного потенциала в отношении продукции супероксид аниона ($p = 0,001$) и снижением резерва синтеза гидроксильного радикала, перекиси водорода и гипохлорной кислоты ($p < 0,0001$).

Выявленные изменения биоцидности и флогогенного потенциала клеток происходили на фоне критического изменения уровня половых гормонов.

Данных таблицы 1 указывают на статистически значимое снижение концентрации эстрадиола в сравнении с показателем контрольной группы ($p = 0,0002$), сопровождающееся значительным повышением уровня тестостерона и коэффициента эстрогении у больных АС ($p < 0,0001$).

Выявленные девиации гормонального спектра коррелировали с показателями кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов.

Результаты исследования взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофилов и концентрации половых гормонов у больных АС представлены в таблице 2.

Из представленных в таблице 2 данных видно, что выявлена средняя прямая корреляция между показателями. Уровень эстрадиола коррелирует с резервным потенциалом продукции активных форм кислорода нейтрофилами ($R = 0,53$; $p < 0,05$). Обнаружена сильная обратная корреляционная зависимость между концентрацией тестостерона, резервными возможностями и уровнем продукции супероксидного анион-радикала ($p < 0,05$). При этом резервный потенциал производства свободных радикалов кислорода прямо коррелирует с концентрацией тестостерона ($R_s = 0,73$; $p < 0,05$).

Известно, что половые гормоны проецируют свои эффекты на многие мишени, включая клетки иммунной системы, оказывая непосредственное воздей-

ствие на развитие и функции иммунцитов, а также восприимчивость клеток и тканей к повреждению от аберрантных (аутоиммунных) процессов [5].

Результаты эпидемиологических и клинических исследований свидетельствуют о повышении уровня воспалительных биомаркеров (IL-6, IL-1 β , TNF- α и CRP) в ответ на дефицит тестостерона [12]. Одновременно имеются экспериментальные данные, указывающие на подавление тестостероном окислительного стресса нейтрофилов исключительно за счет снижения образования супероксидного радикала [6].

Выявленные при АС обратные корреляции концентрации тестостерона, уровня продукции супероксидного аниона и его резервного потенциала подтверждают экспериментальные данные. Однако обнаруженная сильная прямая взаимосвязь между суммарным флогогенным потенциалом нейтрофилов и уровнем тестостерона требует дальнейшего изучения.

Влияние эстрогенов на нейтрофильные гранулоциты осуществляется путем взаимодействия с альфа-рецептором эстрогена (ER α) и бета-рецептором эстрогена (ER β), которые экспрессируются нейтрофилами. Уменьшение содержания эстрогенов способствует увеличению хемотаксической подвижности нейтрофилов, приводит к их накоплению в очаге воспаления, стимулирует синтез ИЛ-6 и ИЛ-8 и увеличивает продукцию ФНО- α , который значительно усиливает системные воспалительные проявления [10].

Взаимосвязь концентрации эстрадиола и резервного потенциала клеток объясняется, вероятно, способностью эстрадиола угнетать фагоцитарную активность нейтрофилов, одновременно стимулируя окислительный метаболизм клеток [3].

Действие эстрадиола сопровождается потерей зернистости, экспрессией эластазы, гиперпродукцией свободных радикалов кислорода, ингибированием каспазы 3/9, задержкой апоптоза, увеличением синтеза молекул клеточной адгезии и усиления взаимодействия с эндотелиальными клетками. Нейтрофилы синтезируют цитокины и хемокины (CXCL1 и CXCL8), осуществляя презентацию антигена, и экс-

Таблица 2. Матрица корреляций показателей функциональной активности нейтрофилов и концентрации половых гормонов у больных анкилозирующим спондилитом

Показатель	Эстрадиол, пмоль/л	Тестостерон, нмоль/дл	Коэффициент Т/Э, %
сХЛлл, $\times 10^4$, имп./мин	-0,28	0,42	0,31
иХЛлл, $\times 10^4$, имп./мин	0,53*	0,17	-0,16
сХЛлн, $\times 10^4$, имп./мин	0,12	-0,53*	-0,43
иХЛлн, $\times 10^4$, имп./мин	0,17	-0,69*	-0,63*
КА ХЛлл, Ед	0,42	0,73*	0,14
КА ХЛлн, Ед	-0,16	-0,32	-0,19

Примечание: * – $p < 0,05$.

прессируют поверхностные рецепторы, необходимые для привлечения и активации моноцитов, DCs и Т-лимфоцитов, демонстрируя центральную роль нейтрофилов в регулировании врожденного и адаптивного иммунных ответов [8].

ВЫВОДЫ

При АС наблюдается усиление кислородзависимого метаболизма нейтрофилов, сопровождающееся повышением резерва продукции супероксид аниона и снижением резерва образования гидроксиль-

ного радикала, перекиси водорода и гипохлорной кислоты.

Изменение биоцидности клеток происходит на фоне снижения концентрации эстрадиола и значительно повышения уровня тестостерона и коэффициента эстрогении.

Установлено наличие взаимосвязи между показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и концентрацией половых гормонов у больных АС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Некрасова, И. В. Женские половые стероидные гормоны в регуляции ферментативной активности нейтрофилов / И. В. Некрасова, С. В. Ширшев // Доклады Академии наук. – 2013. – Т. 453, № 6. – С. 690–693.
2. Estrogen signaling through the G protein-coupled estrogen receptor regulates granulocyte activation in fish / I. Cabas [et al.] // J. Immunol. – 2013. – Vol. 191(9). – P. 4628–4639.
3. Neutrophils and neutrophil serine proteases are increased in the spleens of estrogen-treated C57BL/6 mice and several strains of spontaneous lupus-prone mice / R. Dai [et al.] // PLoS One. – 2017. – Vol. 12(2). – e0172105.
4. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview / V. Delgado-Rizo [et al.] // Front Immunol. – 2017. – Vol. 8. – P. 81.
5. GubbelsBupp, M. R. Androgen-Induced Immunosuppression / M. R. GubbelsBupp, T. N. Jorgensen // Front Immunol. – 2018. – Vol. 9. – P. 794.
6. Testosterone suppresses oxidative stress in human neutrophils / D. P. Marin [et al.] // Cell Biochem Funct. – 2010. – Vol. 28. – P. 394–402.
7. Wright Neutrophil activation signature in juvenile idiopathic arthritis indicates the presence of low-density granulocytes / K. Ramanathan [et al.] // Rheumatology (Oxford). – 2018. – Vol. 57(3). – P. 488–498.
8. 17 β -Estradiol Protects Females against Influenza by Recruiting Neutrophils and Increasing Virus-Specific CD8 T Cell Responses in the Lungs / D. P. Robinson [et al.] // J. Virol. – 2014. – Vol. 88(9). – P. 4711–4720.
9. Shindo, S. Serine 216 Phosphorylation of Estrogen Receptor α in Neutrophils: Migration and Infiltration into the Mouse Uterus / S. Shindo, R. Moore, M. Negishi // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(12). – e84462.
10. ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation / D. Stojkov [et al.] // J. Cell Biol. 2017. – Vol. 216(12). – P. 4073–4090.
11. Activation of TAK1 by Chemotactic and Growth Factors and Its Impact on Human Neutrophil Signaling and Functional Responses / S. Sylvain-Prevost [et al.] // J. Immunol. – 2015. – Vol. 195(11). – P. 5393–5403.
12. Do Androgens Modulate the Pathophysiological Pathways of Inflammation? Appraising the Contemporary Evidence / A. Traish [et al.] // J. Clin. Med. – 2018. – Vol. 7(12). – P. 549.

HORMONAL IMBALANCE AND NEUTROPHIL FUNCTIONAL ACTIVITY IN ANKYLOSING SPONDYLITIS

M. L. Scherbakova, A. O. Kononova, M. V. Ilyin, N. A. Lapkina, A. A. Baranov

ABSTRACT Objective – to study the correlation between sex hormones concentrations and neutrophil redox regulation in patients with ankylosing spondylitis.

Material and methods. 82 patients with ankylosing spondylitis were examined. Authors used ficoll-urografin double density gradient to isolate neutrophils. The chemiluminescent method was used to evaluate neutrophil-ROS-generating capacity. Method of immunoferment detection was used to determine estradiol and testosterone concentrations.

Results. The increase of neutrophil free radicals production associated with the increase of superoxide anion generating capacity and decrease of neutrophil-ROS-generating capacity were observed in ankylosing spondylitis. These changes of cell biocidity were associated with the decrease of estradiol concentration, the increase of testosterone level and estrogenic ratio. The direct correlation between estradiol level and neutrophil-ROS-generating capacity was detected. The strong correlation between testosterone concentration, neutrophil-ROS-generating capacity and superoxide radical level was revealed. ROS-generating potential of neutrophils was directly connected to testosterone concentrations.

Conclusion. The increase of neutrophil redox regulation which was followed by the heightening of superoxide anion production capacity and decrease of neutrophil-ROS-generating capacity against the background of the decrease of estradiol concentration, the increase of testosterone level and estrogenic coefficient which were correlated to the indices of neutrophil functional activity were observed in ankylosing spondylitis.

Keywords: ankylosing spondylitis, neutrophil, estradiol, testosterone.